



(19) BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND

DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT(12) Offenlegungsschrift
(10) DE 197 36 641 A 1(5) Int. Cl. 6:
G 01 N 35/00G 01 N 33/50
G 01 N 33/53
G 01 N 33/532
G 01 N 33/557
G 01 N 33/551
G 01 N 33/52
G 01 N 37/00
G 01 N 33/02
G 01 N 33/18
G 01 N 33/24
C 12 Q 1/68

// G01N 33/535, 33/552,35/08,21/64, 21/76,21/55,21/03

(71) Anmelder:

Weller, Michael G., Dr., 81375 München, DE;
 Nießner, Reinhard, Prof. Dr., 82319 Starnberg, DE;
 Schütz, Andreas, 82110 Germering, DE; Winklmair,
 Michael, 81377 München, DE

(72) Erfinder:

gleich Anmelder

(56) Entgegenhaltungen:

DE	41 28 846 C2
DE	1 95 46 535 A1
DE	1 95 12 717 A1
DE	44 24 030 A1
AT	3 76 117
US	55 45 531
US	55 08 200
US	47 89 804
EP	03 96 016 A2
WO	94 27 137 A2

Spektrum der Wissenschaft, Okt. 1991, S. 100-106;
 Biotechniques, Vol.17, 1994, S. 516-524;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(54) Verfahren und Vorrichtung zur parallelen Messung von mehreren Analyten in komplexen Mischungen

(57) Bekannte Verfahren zur parallelen Messung von mehreren Analyten in komplexen Matrices sind mit so vielen praktischen Problemen behaftet, daß eine Umsetzung für die Anwendung auf reale Proben bisher nicht möglich erschien. Das in der Anmeldung beschriebene Verfahren kombiniert nun mehrere leistungsfähige Prinzipien, wie die Anwendung von sensitiven Mehrkanaldetektoren, die Markierung mit sensitiv nachweisbaren Molekülen, die Anwendung eines reproduzierbaren Fließsystems, die Immobilisierung von Reagenzien auf kleinen Flächen, die Anwendung von Bindungsreagenzien mit modernen Methoden der Datenanalyse. Gerade die Nutzung der normalerweise unerwünschten Kreuzreaktionen zur Informationsgewinnung ermöglicht zusammen mit einigen speziellen Problemlösungen nicht nur eine Identifizierung von Substanzen, sondern auch die Analyse von Mischungen erheblicher Komplexität. Die ungewöhnliche Skalierbarkeit, die anderen Systemen weitgehend fehlt, eröffnet die Möglichkeit, die Parallelanalyse auf viele Stoffe durchzuführen, ohne die Meßvorrichtung komplexer zu gestalten.

DE 197 36 641 A 1

DE 197 36 641 A 1

Beschreibung

1. Einleitung

- 5 Bisher konnten Chemo- und Biosensoren nur sehr bescheidene Anwendungsbereiche erschließen. Dies ist u. a. darauf zurückzuführen, daß die Meßinformation zu wenig umfangreich ist und zu stark von äußeren Faktoren beeinflußt wird. Dies macht das Meßergebnis zu unsicher, um in vielen Anwendungen akzeptabel zu sein. Bei z. B. Immunsensoren/Immunoassays führen die sog. Kreuzreaktionen dazu, daß in einer unbekannten Probe keine Einzelstoffinformation erlangt wird, sondern nur schwer und nur von hochqualifizierten Fachleuten interpretierbare "Äquivalente" erhalten werden.
- 10 Dies ist für die meisten Meßaufgaben nicht ausreichend, so daß eine zusätzliche konventionelle Analytik notwendig wird. Hierdurch ist häufig die Sensortechnik nicht konkurrenzfähig gegenüber anderen Verfahren. Das andere Problem ist die Multianalytfähigkeit. Kaum ein Anwender möchte nur einen einzigen Analyten in konstanter Matrix bestimmen. Häufig ist sogar unbekannt, was genau gesucht wird. Bei Einzelstoff-Verfahren, so preisgünstig und schnell sie auch sein mögen, verkehren sich die Vorteile bald in Nachteile, sobald mehrere Analyten gesucht werden, denn der Aufwand ist
- 15 additiv. Mehrstoff-Verfahren, wie die Chromatographie, sind in diesen Fällen fast immer überlegen. Auch die Kosten sind hier entscheidend. Die Mehrstoff-Verfahren sind umso kostengünstiger, je mehr Analyten gleichzeitig bestimmt werden können. Leider sind konventionelle Mehrstoff-Verfahren (wie Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Kopplung) sehr teuer und können in vielen Fällen aus Kostengründen nicht angewendet werden. Zudem sind diese Verfahren langsam und benötigen sehr gut ausgebildetes Personal. Verfahren, wie das in der Anmeldung vorgestellte, eröffnen hier Möglichkeiten für zahllose neue Anwendungen, die auch am Markt in hohem Maße wettbewerbsfähig sein dürften. Die Kosten einer derartigen Analyse sollten um mindestens den Faktor 10 unter denen einer üblichen Multianalytbestimmung liegen.

2. Stand der Technik

- 25 Die Chemo-/Biosensorik an sich ist in einer schwierigen Situation. Die vor vielen Jahren noch sehr optimistischen Prognosen haben sich allgemein als falsch erwiesen. Der kommerzielle Durchbruch von chemischen/biochemischen Sensoren ist bis heute fast vollständig ausgeblieben. Dies zeigt, daß die entscheidenden Probleme bisher nicht gelöst werden konnten. Die meisten Ansätze, wie piezoelektrische Sensoren (Quarzmikrowaagen, Surface-Acoustic Wave-Sensoren,
- 30 Lamb-Wave-Sensoren u.ä.), elektrochemische Sensoren (Amperometrie u. a.), optische Sensoren ohne Label (Surface-Plasmon-Resonance (SPR), Interferometrie etc.), optische Sensoren mit Label (Evanescence-Wave-Sensoren, Flow-Immunoanalyse-Systeme u.v.a.) konzentrierten sich zuerst auf die Realisierung eines "Einkanal"-Sensors für einen Analyten (bzw. eine Analytgruppe). Diese Ansätze waren praktisch alle mit den o.g. Nachteilen behaftet. Auch wenn sich langsam die Notwendigkeit einer Multianalytmessung durchsetzt, enden die meisten Ansätze hier in einer Sackgasse: Es muß fast
- 35 immer der komplette Meßaufbau mit n multipliziert werden, wenn n Analyten gemessen werden sollen. Auch mit einer optimistischen Berechnung der Massenfertigungskosten ist einleuchtend, daß hier meistens bei ca. 10 Sensoren die technische und kommerziell sinnvolle Obergrenze liegt. Alles andere wird inakzeptabel kompliziert und teuer. Hieraus folgt zwangsläufig, daß die bisher vorgestellten und bekannten Sensoren weder für eine richtige Multianalytfähigkeit geeignet sind, noch die Probleme der Kreuzreaktionen konsequent angegangen werden können.
- 40 Das BIACore-System (z. B. US 5313264) ist wohl das kommerziell erfolgreichste Konzept bis dato. Das Verfahren benutzt eine labelfreie Detektion, die auf Brechungsindexveränderungen basiert. Das System ist besonders sinnvoll für Forschungszwecke, um z. B. kinetische Konstanten von biochemischen Bindungsmolekülen zu untersuchen bzw. zu vermessen. Zwar wurden auch Geräte mit mehreren Kanälen vorgesehen, um z. B. Referenzproteine vermessen zu können, eine Parallelisierung im Sinne der vorliegenden Anmeldung scheint aber aufgrund des komplizierten technischen Aufbaus unmöglich. Da auch alle Patente auf diesem Gebiet auf das Surface-Plasmon-Resonance (SPR) System beschränkt sind, ist davon die vorliegende Anmeldung nicht betroffen. Vergleichbar in der Anwendung ist das System, das in Bioforum 3/1996, S. 92 beschrieben wird.

Murex (in US 5096807) hat ein System beschrieben, das auf einer simultanen Detektion von mehreren lichterzeugenden Probenvolumina beruht. Das Patent bezieht sich vorwiegend auf die Detektion von Signalen und spart die Biochemie weitgehend aus. So ist auch aus Fig. 3 und Fig. 4 erkennbar, daß erstens nur sehr wenige parallele Systeme ausgelesen werden sollen und zudem von einem dem Standard-Mikrotiterplattenformat sehr ähnlichen Aufbau ausgegangen werden soll. So werden in US 5599720 getrennte Reaktionsgefäße mit separaten chemischen Systemen vorausgesetzt. Es wird nicht, wie in der vorliegenden Anmeldung, ein System verwendet, das primär aus einer einzigen Reaktionskammer besteht. Zudem fehlen auch sämtliche Charakteristika, die für eine Multianalytfähigkeit auf der Basis von Kreuzreaktionen notwendig sind. Sehr ähnlich ist DE 36 12 873 A1 zu bewerten.

In US 5413939 ist eine "Immuno-CD", also eine Scheibe mit immobilisierten Reagenz-Punkten, beschrieben, die auf einer interferometrischen Messung beruht. Das Patent bezieht sich vollständig auf meßtechnische Aspekte. Chemische Probleme einer derartigen Immuno-CD bleiben ausgeklammert. Auch von der Detektionsseite betrifft dieses Patent die vorliegende Anmeldung nicht, da es sich hier um ein typisches sequentielles System und nicht um ein paralleles handelt. Hiermit werden z. B. die Auslesezeiten mit der Skalierung der Analytanzahl proportional höher, was zu einer höheren Grenze der sinnvollen Punktanzahl führt. Zudem ist bekannt, daß interferometrische Verfahren zur Analytik von Substanzen bisher zu unempfindlich und oft auch zu unselektiv sind, um breit anwendbar zu sein.

Boehringer Mannheim hat ein Patent angemeldet (DE 44 35 727), in welchem ein Array von Bindemolekülen beschrieben wird. Die Ansprüche sind jedoch nur auf sich nicht berührende Metallschichtspots beschränkt. Die vorliegende Anmeldung benötigt keine Metallspots und ist daher von DE 44 35 727 nicht betroffen. Zudem werden für die vorliegende Anmeldung deutlich kleinere und dichtere Spot-Arrays bevorzugt.

Affymax hat ein paralleles Oligonucleotid-System z. B. zur Sequenzierung von DNA bzw. zum Screening von kombinatorischen Peptidbibliotheken realisiert. Da das System weder zur hochempfindlichen Spurenanalytik unbekannter

Substanzen, noch zur echten Parallelanalytik (das System wird sequentiell gelesen) verwendet wurde, betrifft nur das Einzelmerkmal Parallelisierung an sich die Anmeldung. Die Lesung des Kreuzreaktionsproblems und die Analyse beliebiger Substanzen auf einem Chip wurde von Affymax nicht beschrieben. In US 5545531 wird eine Mikrotiterplatte vorgestellt, bei der die einzelnen Kavitäten mit je einem DNA-Chip ausgerüstet sind. Die vorliegende Anmeldung zielt gerade nicht auf ein Mikrotiterplattensystem ab. Zudem wird in US 5545531 die Auslesung sequentiell durchgeführt, was gleichfalls dem Sinn der vorliegenden Anmeldung widerspricht. Letztlich ist US 5545531 weder für Nicht-Nukleinsäure-Derivate vorgesehen, noch zur quantitativen Analytik von komplexen Analytmischungen geeignet. US 5324633 hingegen ist ganz auf die Bestimmung von Affinitätskonstanten bezogen und zielt nicht auf die Analytik von Proben.

Multilyte Ltd. bzw. R. Ekins halten zwei Patente (US 5171695, US 5432099), die Parallelsensoren zum Thema haben. US 5171695 beschreibt die Verwendung eines Systems, das räumlich getrennte, immobilisierte Reagenzpunkte aufweist. Das System erfordert jedoch die Verwendung von Doppelmarkern, sowie die Bedingung, daß nur ein insignifikanter Anteil der Probe gebunden werden darf. Auch erfordert US 5171695 explizit die Verwendung hochselektiver Reagenzien, da für das Auftreten unerwünschter Kreuzreaktionen keine Lösung vorgestellt wird. Diesen Einschränkungen unterliegen die in dieser Anmeldung vorliegenden Systeme nicht. In US 5432099 wird die unter US 5171695 beschriebene Methodik weiter ausgebaut, wobei insbesondere Ansprüche für spezielle Beschichtungsdichten, Spot-Größen, Affinitätskonstanten und Volumina aufgeführt sind. Da wie bei US 5171695 schon erwähnt, das in der Anmeldung vorliegende System nicht auf den in den US-Patenten genannten restriktiven Randbedingungen beruht und damit wesentlich vielseitiger einsetzbar ist, sind die auch in US 5432099 aufgeführten Ansprüche hier nicht relevant. Auch fehlt es in US 5432099 an einer konkreten Umsetzung, z. B. beruht die Zeichnung vollständig auf theoretischen Grundlagen. Auch das erwähnte "Ambient-Analyte-Verfahren" bezieht sich auf einen speziellen Grenzfall von Immunoassays, der jedoch für die vorliegende Anmeldung von geringer Bedeutung ist.

Basierend auf Forschungsarbeiten an der GBF in Braunschweig wurde kürzlich die erste Kommerzialisierung eines für die On-line-Analytik vorgesehenen Immunsensors eingeleitet (U. Bilitewsky et al., und DE 196 06 267 A1). Da jedoch wie schon beschrieben, in diesem Ein- oder Wenig-Kanal-System die echte Multianalytfähigkeit und das Handling mit Kreuzreaktionen fehlt, ist von diesem Patent die vorliegende Anmeldung nicht betroffen. Vergleichbar ist DE 196 20 636 A1, das ein System mit einer Kapillare vorstellt. Die Bewertung ist ähnlich wie DE 196 06 267 A1.

3. Beschreibung des Verfahrens

Die Erfindung umfaßt ein System, bestehend aus einer chemischen oder biochemischen Meßvorrichtung, die eine räumliche (bevorzugt zweidimensionale) Anordnung von Teilmesssystemen (Arraystruktur) zur Messung der Zusammensetzung eines Fluids einschließt. Diese Meßsysteme sind räumlich getrennt angeordnet, werden aber normalerweise nicht physikalisch voneinander abgeschottet, wobei jedoch partielle Abschottungen durchaus dem Sinn der Erfindung entsprechen. Die Erfindung wird zudem dadurch gekennzeichnet, daß eine quasi-gleichzeitige (parallele) Messung und quasi-gleichzeitige Datenverarbeitung ermöglicht wird. Die Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß die Arraystruktur sehr einfach erweitert werden kann, ohne explizit zusätzliche Einzelmeßsysteme zu benötigen. Die Erfindung ist auch dadurch gekennzeichnet, daß die Arraygröße sehr hoch sein kann, und charakteristischerweise über 10 Einzelsysteme (bevorzugt 1000 oder mehr) umfaßt.

Die Meßvorrichtung besteht bevorzugt aus einer mit Affinitätsmolekülen beschichteten Platte, die in eine Flüssigkeitskammer integriert ist. Die Affinitätsmoleküle werden in einer räumlich nachvollziehbaren Weise mit üblichen Immobilisierungsmethoden aufgebracht. Die Messung erfolgt nun z. B. in einer sog. kompetitiven Weise mittels markierter Substanzen, die gezielt mit einer Untergruppe (wobei die Untergruppe auch die Gesamtheit erfassen kann) der Affinitätsmoleküle in Wechselwirkung gebracht werden. Unter Affinitätsmolekülen versteht man im Sinne der Erfindung alle Moleküle, die mehr oder weniger selektive Wechselwirkungen mit anderen Molekülen eingehen können (z. B. Antikörper, Antigene, Protein A, Avidin, Streptavidin, Biotin (sowie -derivate), Lectine, Nucleinsäuren, Enzyme, Proteinfragmente, rekombinante Varianten der genannten Proteine, Haptene, auch Mischungen derselben, Kavitanen, Komplexliganden, Indikatoren, farbstoffgekoppelte Moleküle, Fluoreszenzliganden u.ä.). Als Markierung kommen Fluoreszenzfarbstoffe, Radioisotope, stabile Isotope, chemilumineszenzfähige Moleküle (z. B. Luminol-Derivate, Acridiniumester, Adamantylidendioxetane u.ä.), Biolumineszenzmarkierungen (Aequorin, Luciferase u.ä.), und bevorzugt Enzyme (Mitterlich-Peroxidase, Alkalische Phosphatase, beta-Galactosidase, Penicillinase, Glucose Oxidase, Luciferase u.ä.) in Frage. Enzyme lassen sich wiederum mit verschiedenen Methoden detektieren (z. B. colorimetrisch mit ABTS(R), Tetramethylbenzidin, Guajacol, 4-Nitrophenylphosphat etc., oder fluorimetrisch mit p-Hydroxyphenylessigsäure etc., oder bevorzugt durch Chemilumineszenz (Luminol, verstärkte Luminolreaktion, AMPPD etc.).

Die Reaktion der Affinitätsmoleküle (immobilisiert) mit den markierten Molekülen wird durch ein geeignetes, quasi-paralleles Meßsystem detektiert, bevorzugt einer CCD-Kamera mit Intensifier oder ohne Intensifier mit back-illuminated-Anordnung. Die Meßkammer und das Detektionssystem sind mit einer geeigneten optischen Einrichtung verbunden, die Fasern, Linsen und Spiegel beinhalten können, bevorzugt wird ein Linsensystem hoher Lichtstärke. Die CCD-Kamera muß mindestens so viele Pixel besitzen, wie unabhängige Meßkanäle erforderlich sind. Die Optik sollte eine Abbildung der Meßspots ungefähr in einem Abbildungsmaßstab 1 : 1 ermöglichen, welcher einen guten Kompromiß zwischen Systemgröße und Empfindlichkeit darstellt. Kleinere Abbildungsmaßstäbe führen z. B. zu Empfindlichkeitsgewinnen in der Detektion, jedoch zu einer relativen Vergrößerung der Meßspots. Ein Abbildungsmaßstab von ca. 1 : 1 ist für Linsensysteme relativ aufwendig, dagegen für faseroptische Systeme sehr günstig und platzsparend. Das System kann in eine lichtdichte Dunkelkammer platziert werden, um Störlicht aus der Umgebung weitgehend auszuschließen. Bei bestimmten Systemen kann auch ein Shutter (Verschluß) sinnvoll oder sogar notwendig sein. Es können daher mechanische und/oder optische und/oder akusto-optische Verschlüsse und/oder Blenden und/oder andere optische Elemente (z. B. Schalter) in das optische System eingefügt sein. Im Sinne der Anmeldung sind jedoch auch andere optische Detektionsverfahren, ob mit (z. B. Fluoreszenz, Phosphoreszenz) oder ohne Markierung (z. B. Surface-plasmon resonance, Interferometrie) geeignet. Auch nicht-optische Detektionsverfahren (siehe Anspruch 13) sind einsetzbar. Die Reaktanden wer-

DE 197 36 641 A 1

den bevorzugt mit einer oder mehreren Pumpen (z. B. Schlauch-, Zahnrad- oder bevorzugt Kolbenpumpen) in die Meßkammer gepumpt. Es kann aber auch die Schwerkraft, Kapillarkraft oder Über- bzw. Unterdruck genutzt werden.

In der einfachsten Ausführung besitzt die Meßvorrichtung nur eine einzige Meßkammer (z. B. Abb. 3). Für einige Anwendungen kann es jedoch günstig sein, die Meßkammer zu unterteilen oder mehrere Meßkammern zu verwenden. Die

- 5 Abschottungen können u. a. folgende Zwecke haben: Verhinderung/Verminderung von gegenseitigen Reagenzienstörungen, simultane Verdünnungsreihe zur Meßbereichserweiterung, verbesserte Nutzung von Kreuzreaktionen, cyclische Regenerierung (Erhöhung der Meßfrequenz), Abgrenzung von Substanzgruppen-Reagenzien, Parallelmessung von mehreren Proben, Vermessung von Referenzproben (Negativprobe, Standard-Lösungen), es werden zusätzliche Freiheitsgrade zur Analyse gewonnen (z. B. Substanzeidentifikation, Verifikation, Quantifizierung), durch z. B. Variation der Meßparameter, Zusatz von Additiven (wie Tensiden, Lösungsmitteln, pH-verschiebenden Puffern, Inhibitoren, Komplexbildnern, Bindungsmolekülen zur Unterdrückung von Störungen (auch Antikörpern, Haptenen) und zur Messung von kinetischen oder thermodynamischen Konstanten oder deren Äquivalenten. Die Kammer kann aus verschiedensten Materialien bestehen, wie Glas, Quarzglas, Metall (bevorzugt sind Edelmetalle, Edelstahl oder Titan), Kunststoffe (bevorzugt sind Fluoropolymere, wie Polytetrafluorethen, PTFE) oder beschichteten Materialien. Die austauschbare Wand kann 10 gleichfalls aus ähnlichen Materialien bestehen, wobei ggf. lichtdurchlässige Materialien notwendig sind (z. B. bei optischer Detektion). Es können auch zusätzliche Unterteilungen der Meßkammer (bzw. mehrere Meßkammern) vorhanden sein. Die Unterteilungen können in einer Ebene liegen (Chip in parallele Flusskanäle aufgeteilt und/oder wie ein Fensterkreuz aufgeteilt und/oder wie (ggf. verzerrte) Bienenwaben aufgeteilt) und/oder gestaffelt untereinander angeordnet sein (Kammerstapel mit transparenten und/oder lichtundurchlässigen Wänden). Die Meßkammer und andere Teile des Systems können optional in einer Dunkelkammer aus lichtundurchlässigem Material untergebracht werden. Das Verfahren ist auch dadurch gekennzeichnet, daß bevorzugt ein Fließsystem mittels Pumpe(n) und/oder Ventil(en) verwendet wird. Optional können Filter, Entgaser, Blasenfallen, Pulsationsdämpfer, Restriktoren, Verteiler, Autosampler und Probenahmehilfen eingesetzt werden. Für die Immobilisierung von Reagenzien werden bevorzugt Mikropumpen (besonders bevorzugt Piezopumpen nach dem ink-jet-Prinzip mit Tröpfchen-Ausstoß), photolithographische Verfahren, Druckverfahren, 15 Sprühverfahren, und/oder eine Kombination dieser Techniken verwendet. Für die Immobilisierung von Reagenzien werden bevorzugt hydrophobe Oberflächen (silanisiertes Glas, Kunststoff u.ä.), photochemisch aktivierbare Oberflächen, chemisch aktivierte Oberflächen, chemisch aktivierte Reagenzien, selbstorganisierende Schichten (wie Alkylthiol-Derivate auf Goldoberflächen), Streptavidin/Biotin-Systeme, Protein A, Protein G, Sekundärantikörper, Polymere, Sol-Gel-Gläser, Gele oder membranähnliche Strukturen verwendet.

- 20 Für eine Regenerierung werden bevorzugt wässrige Lösungen verwendet, deren pH-Wert mehr als 2 Einheiten nach unten oder oben von pH 7 abweicht, ganz besonders bevorzugt Lösungen mit einem pH von 1 bis 3. Bevorzugt werden auch Lösungen mit Harnstoff und/oder Guanidiniumhydrochlorid und/oder Zusätzen von organischen Lösungsmitteln, und/oder Tensiden, die eine konformationsändernde und/oder partiell oder vollständig denaturierende bzw. struktur- oder 25 eigenschaftsverändernde Wirkung auf Bindungsmoleküle aufweisen. Bevorzugt werden auch Lösungen mit Enzymen, die Reagenzien abspalten oder in kleinere Teile zerlegen können, ganz besonders bevorzugt werden hier Proteasen (z. B. Pepsin) und Peptidasen (bzw. Nucleasen). Neben der Regenerierung im engeren Sinn, kann auch die Unschädlichmachung der Markierung angewendet werden (bei Peroxidase-Markierung wird die Verwendung von Wasserstoffperoxid in einer Konzentration von 0,1–5% bevorzugt). Zur Anwendung kommen mathematische Verfahren, die den Aktivitätsverlust bei jedem Meßschritt berechnen und alle Meßwerte entsprechend korrigieren.

- 30 Der Detektor, ggf. notwendige Ventile, Autosampler oder ähnliche Peripheriegeräte werden über ein Rechnersystem programmiert gesteuert. Die Auswertung der Meßdaten soll bevorzugt über ein leistungsfähiges Rechnersystem erfolgen, um die Ergebnisse möglichst ohne Verzögerung zur Verfügung zu haben. Die Auswertung ist ein wichtiger Teil der Erfindung, da damit die ursprünglich unabhängigen Teilmeßwerte zusammengeführt werden. Die Auswertung geschieht mit sog. chemometrischen Methoden, die in ihrer Kombination die weitgehende Eliminierung des Kreuzreaktionsproblems ermöglichen und zudem die Multianalytfähigkeit unterstützen. Es hat sich herausgestellt, daß übliche chemometrische Verfahren, die schon zur Multianalyt-Bestimmung eingesetzt wurden (wie neuronale Netze, multivariate Regression) bei den vorgestellten Systemen nur von begrenztem Nutzen sind. Limitierend wirkt sich die Akkumulation von Fehlern aus, da viele Kanäle nicht zur einzelnen Information beitragen und nur den Gesamtfehler erhöhen. Dies kann verhindert werden, wenn möglichst viele Vorinformationen in die Auswertung einfließen und implizit vorausgesetzt werden. So werden für die Auswertung eines einzelnen Analyten nur wenige Kanäle hohen Informationsgehalts verwendet, die restlichen Informationen werden für diesen Analyten nicht verwertet. Für den nächsten Analyten werden wiederum andere Kanäle herangezogen (eine Überlappung ist jedoch möglich). Auch sollten die Responsefunktionen stark beschränkt werden, da ansonsten der Kalibrieraufwand extrem stark ansteigt. Es ist offensichtlich, daß bei fast allen Proben die überwiegende Anzahl der Spots kein positives (ggf. Inhibitions-)Signal liefert und daher die zu verarbeitenden Daten 40 sehr stark reduziert werden können. In vielen Fällen kann sogar eine Mischkalibrierung durchgeführt werden. Die chemometrische Auswertung erlaubt zusätzlich, die Meßwerte zu bewerten und Fehler zu entdecken.

Ausführungsbeispiel 1

- 45 In Abb. 1 und 2 ist eine Vorrichtung dargestellt, die ein Ausführungsbeispiel für die praktische Umsetzung des in der Anmeldung beschriebenen Verfahrens ist. Die experimentellen Daten wurden an diesem oder an sehr ähnlichen Vorrichtungen gewonnen.

1. Direktes Assayformat

- 50 65 1.1 Immobilisierung von Antikörpern auf dem festen Träger

Glasträger (z. B. Objektträger für die Mikroskopie) werden gereinigt und silanisiert. Dazu werden die Glasträger etwa

eine Stunde bei Raumtemperatur in eine etwa 5%ige Lösung von Trimethylchlorsilan in Isopropanol eingetaucht und anschließend mit Isopropanol und Methanol gewaschen. Die silanisierten Glasträger werden vor Gebrauch bei Raumtemperatur für 24 Stunden getrocknet. Monoklonale oder polyklonale Antikörper werden in basischem Carbonat-Puffer (pH 9.6) gelöst. Um das Eintrocknen der Antikörper auf dem Glasträger zu verhindern, werden 25% Glycerin zugemischt. Dann werden kleine Spots (etwa 1 µL) dieser verdünnten Antikörperlösungen auf den silanisierten Glasträger pipettiert. Man läßt bei Raumtemperatur etwa zwei Stunden inkubieren und wäscht dann die Glasträger gründlich mit einem auf Phosphat basierenden Puffer (Waschpuffer, pH ca. 7.5). Der Puffer enthält Tween 20, um eventuell anhaftende Mehrfachschichten von Antikörpern abzuwaschen.

1.2 Blocking

5

Nach dem Spülen mit Waschpuffer werden die Chips in eine Lösung aus 0,5% BSA, 0,5% Casein und 4% Tween 20 in Phosphatpuffer (pH 7,5) getaucht. Vor Gebrauch läßt man die Chips mindestens eine Stunde lang in dieser Lösung stehen und spült sie vor dem Einbau in die Küvette gründlich mit Waschpuffer, um lose anhaftende Blockingreagenzien abzuwaschen. Die Chips können ohne signifikanten Verlust der Aktivität bis zu 24 Stunden in dieser Blocking-Mischung stehen gelassen werden.

15

1.3 Durchführung der Bestimmung

15

1.3.1 Assayprotokoll

20

Der mit immobilisierten Antikörpern beschichtete Glasträger (Chip) wird in die Durchflußküvette eingebaut. Soll der Blindwert gemessen werden, wird der Tracer nur mit Wasser gemischt. Werden dagegen Proben vermessen oder Kalibrierungen durchgeführt, wird der Tracer vor der Messung mit Probe oder Kalibrierungslösung vorgemischt. Die Tracerlösung wird in die Küvette gepumpt. Nach einer Inkubationsdauer von fünf Minuten wird genügend Waschlösung durch die Küvette gepumpt, um Tracer und, falls vorhanden, die Analyten vollständig zu entfernen. Dann wird Chemilumineszenz-Substrat in die Küvette gepumpt und mit einer CCD-Kamera ein räumlich aufgelöstes Bild des Glasträgers aufgezeichnet. Dadurch kann jeder einzelne Antikörper-Spot getrennt ausgewertet werden.

25

1.3.1 Kalibrierung

30

Zur Kalibrierung des Systems werden verschiedene konzentrierte Lösungen des Analyten hergestellt, wobei diese Kalibrierungslösungen möglichst den gesamten Meßbereich umfassen sollten. Die einzelnen Analytlösungen werden mit dem Peroxidase-Tracer vorgemischt. Zur Messung des Blindwerts wird nur Peroxidase-Tracer ohne Analyt verwendet. Als interne Referenz jedes einzelnen Chips wird ein gegen Peroxidase gerichteter Antikörper (Anti-POD) verwendet. Dazu bildet man nach der Messung des Blindwerts das Verhältnis zwischen dem Signal jedes auszuwertenden Antikörper-Spots und dem Anti-POD-Signal. Die Höhe des Anti-POD-Signals ist von der Zugabemenge des Analyten weitgehend unabhängig. Bildet man daher nach der Messung eines Kalibrierungspunktes das Verhältnis aus Meßsignal und Anti-POD-Signal und vergleicht dieses Verhältnis mit dem Verhältnis der Blindwerte, dann kann der Grad der Inhibition des einzelnen Antikörper-Spots berechnet werden. Abb. 6 zeigt das Meßsignal einer Blindwert-Messung für einen mit verschiedenen Antikörpern beschichteten Chip. Werden nun auf verschiedenen Chips unterschiedlich konzentrierte Kalibrierungslösungen vermessen, erhält man Kalibrierkurven des Chips bei allen Antikörpern, die mit dem betreffenden Analyten eine ausreichend hohe Kreuzreakтивität aufweisen. Bei dieser Berechnung wird vorausgesetzt, daß jeder das Verhältnis der Blindwerte aller Signale eines Chips von Chip zu Chip konstant ist. Dies gilt jedoch nur, wenn alle Chips einer Meßreihe identisch präpariert und für alle Chips gleiche Antikörperinkubationszeiten verwendet wurden. Abb. 10 zeigt eine auf diese Weise ermittelte Kalibrierungskurve für Terbutylazin, die für einen monoklonalen Antikörper mit hoher Affinität zu dieser Substanz erhalten wurde.

35

40

45

1.3.2 Messung von wäßrigen Proben

50

Zur Messung von Wasserproben wird ein Teil Probe mit einem Teil Tracer verdünnt, wobei die Endkonzentration des Tracers nach dem Verdünnen identisch zu der Konzentration ist, mit der der Blindwert bestimmt wurde. Dann wird die Messung durchgeführt wie unter 1.3.1 beschrieben. Mit dem ermittelten Signal wird aus der Kalibrierungskurve (siehe 1.3.1) des jeweiligen Antikörpers die Konzentration des Analyten bzw. seiner Äquivalente abgelesen.

55

1.3.3 Regenerierung im direkten Assayformat

55

Zur Regenerierung im direkten Assayformat wird eine 0,1 M Glycin-Lösung verwendet, deren pH mit konzentrierter Salzsäure auf den Wert 2,3 eingestellt und mit 10 vol-% 1-Propanol gemischt wurde. Im Anschluß an einen Assayzyklus im direkten Assayformat kann der Chip mit Hilfe dieser Lösung regeneriert werden. Bei der Regenerierung wird die Bindung zwischen immobilisiertem Antikörper und Tracer, sowie – falls vorhanden – zwischen Antikörper und Analyt gelöst und der Chip somit in seinen Ausgangszustand zurückgeführt. Um zu zeigen, daß diese Art der Regenerierung erfolgreich ist, wurden mit einem mit Antikörperspots beschichteten Chip nacheinander mehrere Assayzyklen durchgeführt und Blindwerte (d. h. keine Zugabe von Analyten) gemessen. Zwischen jeder neuen Blindwert-Messung wurde die den Chip enthaltende Küvette mit der oben beschriebenen Lösung mehrmals durchspült und somit regeneriert. Zum Test des Erfolgs der Regeneration wurde nach jeder Regeneration eine Kontrollmessung durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 11 zu sehen. Die Grafik zeigt, daß mit der oben beschriebenen Regenerationslösung tatsächlich der Tracer entfernt bzw. zumindest inaktiviert wird, und daß der Chip nach der Regeneration für eine neue Messung benutzt werden kann.

60

65

Nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen nimmt das Blindwert-Signal soweit ab, daß keine aussagekräftigen Messungen mehr durchgeführt werden können und der Chip gewechselt werden muß. Die genaue Anzahl der mit einem einzigen Chip möglichen Zyklen hängt von den verwendeten Antikörpern, Tracern sowie den individuellen Reaktionsbedingungen ab.

5

1.3.4 Test des Einflusses der Pixelgröße

Um den Einfluß die Pixelgröße des Detektors (hier ein CCD-Chip mit 1100×330 Pixel, jeder Einzelpixel hat eine Fläche von $24 \mu\text{m} \times 24 \mu\text{m}$) auf die Detektion des Signals der einzelnen Spots zu untersuchen, wurde der in Abschnitt 1.3.3 beschriebene Versuch mit zwei verschiedenen Binning-Formaten ausgewertet. Dabei wurde bei der ersten Auswertung ein Binning von $5 \times 5 = 25$ gewählt, entsprechend einer resultierenden Gesamtzahl der Superpixel von 220×66 . Die Kantenlänge jedes entstehenden Pixels beträgt somit $5 \times 24 \mu\text{m} = 120 \mu\text{m}$. Die zweite Auswertung dagegen wurde mit einem Binning von $25 \times 25 = 625$ durchgeführt, entsprechend einer Gesamtzahl der resultierenden Superpixel von 44×13 . Die Kantenlänge der hierbei entstehenden Pixels beträgt somit $24 \times 25 \mu\text{m} = 600 \mu\text{m}$. Der Vergleich der Ergebnisse für beide Bildformate ist in Abb. 11 dargestellt. Aus der Grafik geht hervor, daß beide Formate zu absolut vergleichbaren Ergebnissen führen. Dieser Befund ist von entscheidender Bedeutung für die minimale Spotgröße der verwendeten selektiven Bindungsreagenzien und damit für die in diesem Patent beschriebene Skalierbarkeit der Analytik. Wenn man von kreisförmigen Spots der selektiven Bindungsreagenzien ausgeht und voraussetzt, daß zwischen jedem Spot ein Abstand bestehen soll, der gleich dem Durchmesser der Spots ist, so ergibt sich im oben beschriebenen Fall für das Binning von 5×5 Einzelpixeln eine mögliche Spotzahl von $110 \times 33 = 3630$. Beträgt das Binning jedoch 25×25 Einzelpixel, so beträgt unter den gleichen Annahmen die maximal mögliche Spotzahl $22 \times 6 = 132$. Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch der Abbildungsmaßstab. Je stärker das Licht fokussiert wird, umso höher ist die Intensität auf dem CCD-Chip. Diese Option ist aber insofern limitiert, da das Objekt (der Reagenzspot) entsprechend größer sein muß und bei gleicher Spotanzahl zu einer erheblichen Vergrößerung der Flußkammer führt.

25

Beispiel 2

2. Indirektes ELISA-Format

30

2.1 Kovalente Kopplung von Haptene an eine Glasoberfläche (Abb. 4)

Glasträger (Glasplättchen) werden vor der Verwendung 2 h mit frisch bereiteter Piranha-Lösung (1 Teil Wasserstoffperoxid (30%) + 2 Teile konz. Schwefelsäure) gereinigt. Anschließend wird mit Wasser gewaschen und bei 40°C an Luft getrocknet. Vor der Kopplung der Haptene wird mit den Glasträgern eine Aminosilanisierung durchgeführt, um leicht modifizierbare Gruppen an der Oberfläche zu erhalten. Dazu werden 0,5 ml 2-(Aminoethyl)-3-aminopropylmethoxydimethoxysilan in 50 ml mit Wasser gesättigtem Toluol gelöst. In diese Lösung werden die Glasträger für 12 h eingetaucht. Anschließend wird mit Toluol, Wasser, 0,1 M HCl, Wasser und Methanol gewaschen und für 15 min bei 80°C getrocknet. Man läßt abkühlen. Für die Kopplung der Haptene werden gleiche Mengen von je 0,1 M Lösungen des Haptens (z. B. 2,4-Dichlorphenoxybuttersäure) N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid gemischt und in kleinen Spots (z. B. mit einer Mikropipette) auf die Glasträger aufgetragen. Um niedrige Kopplungsdichten des Haptens zu erreichen, kann dieses mit einem "Blockinghaptent" (z. B. Bernsteinsäure) in beliebigen Verhältnissen gemischt werden. Die Raumtemperatur sollte dabei nicht über 20°C liegen. Am besten wird die Reaktion in einem auf 8°C temperierten Kühlraum durchgeführt. Nach 2 h wird mit Glyme, Wasser und Methanol gewaschen und bei 40°C getrocknet. Um freie Aminogruppen auf dem Chip zu blockieren, wird der Chip über Nacht in eine Mischung aus 50 ml trockenem Tetrahydrofuran, 2 g Bernsteinsäureanhydrid und 1 ml Pyridin getaucht. Nach Waschen mit Dimethoxyethan (Glyme) und Wasser sind die Chips einsatzbereit und können in die Sensorzelle eingebaut werden. Getrocknet sind die beschichteten Chips über Wochen haltbar. Für die Messung wird die in Abb. 1 abgebildete Anordnung verwendet. Über jeweils separate Pumpen werden Regenerationslösung (1 mg/ml Pepsin in Glycin/HCl-Puffer; pH 1,7), Sekundärantikörper (z. B. Anti-Maus; POD-markiert), Substratlösung (Pierce; CL-Substrat); Waschpuffer (Phosphate Buffered Saline (PBS) mit Tween-20-Zusatz) und Wasser dosiert. Im Autosampler wird vor der Messung der Antikörper zur Probe dosiert und das Gemisch injiziert. Der Ablauf des indirekten Immunoassays auf dem Chip ist in Tabelle 1 zu sehen. Zur Regeneration liegen zwar nur begrenzte Daten vor, es konnte aber gezeigt werden (Abb. 9), daß Regenerationen im indirekten Format relativ einfach zu realisieren sind.

55

60

65

Tabelle 1

Ablauf eines indirekten Immunoassays im Sensorsystem

Aktion	Dauer [s]
Waschen	60
Regenerieren; gleichzeitig Mischen von Antikörper und Probe	270
Waschen	60
Inkubation von Antikörper und Probe	300
Waschen	60
Inkubation mit Sekundärantikörper	250
Waschen	60
Substratzugabe und Messung	350
Waschen	60

Das Ergebnis sei an der Messung des Analyten Trinitrotoluol (TNT) exemplarisch für einen Analyten veranschaulicht. 20
Abb. 8 zeigt die Kalibrierungskurve, die mit der oben beschriebenen Methode aufgenommen wurde.

Bedingungen: Antikörper: mAb-TNT; 1 : 10.000 verdünnt; im Verhältnis 1 : 3 mit der Probe (in Wasser) vermischt; PBS-Puffer; 500 µl der Mischung injiziert; Sekundärantikörper: Anti-Maus aus Ziege; 1 : 10 000 verdünnt in PBS-Puffer. Der Chip ist mit Haptenen gegen gegen verschiedene Stoffgruppen beschichtet (z. B. Nitroaromaten, Triazine, Fluorescein). Für die Auswertung wird das Signal der zu analysierenden Stoffgruppe (TNT) mit dem Signal einer nicht in der Probe vorhandenen Stoffgruppe (Triazin, Fluorescein) verglichen. Aus der Änderung dieses Verhältnisses ergibt sich die Kalibrierungskurve. 25

Beispiel 3

Auf Protein A basierendes Immunoassaysystem

Die Glasträger werden wie in Beispiel 1 (direkter Assay) beschrieben silanisiert. Auf die vorbehandelten Träger werden Spots von 0,5 µl einer Lösung von Protein A (1 : 20 000) in basischem Carbonatpuffer (pH 9,6) aufgebracht und für 3 h inkubiert. Anschließend wird mit tensidhaltigem Waschpuffer gewaschen. Für das Blocking werden die Glasträger über Nacht in eine Lösung von je 0,1% Albumin aus Rinderserum (BSA) und Casein getaucht. Nach einem weiteren Waschschnitt werden die Glasträger in das Sensorsystem (**Abb. 3**) eingebaut. Der Ablauf des Assays ist Tabelle 2 zu entnehmen. 35

Tabelle 2

Ablauf des auf Protein A basierenden Immunoassays im Sensorsystem

Aktion	Dauer [s]
Waschen	60
Regenerieren	120
Antikörper Inkubation; gleichzeitig Probenschleife füllen.	280
Waschen	60
Vorinkubation mit Probe	100
Gleichzeitige Inkubation von Probe und Tracer	200
Waschen	60
Substrat; Messung	350
Probenschleife spülen	30

Das Ergebnis einer Kalibrierungsreihe für Trinitrotoluol (TNT) zeigt **Abb. 7**.

Bedingungen: Antikörper: polyklonaler TNT-Antikörper (Serva); 1 : 5000; Boraxpuffer; pH 8,5; Tracer: TNT-POD-Konjugat; 1 : 5000; PBS-Puffer; gemischt im Verhältnis 1 : 1 mit Probe; die Mischung erfolgt automatisch; Regeneration: Glycin/HCl-Puffer; pH 2,3.

Um die Abnahme der Intensität von Zyklus zu Zyklus auszugleichen, wurde jeweils nach zwei Proben ein Nullwert bestimmt. Mit den Nullwerten wurde eine Regression durchgeführt und der gemessene Wert einer jeden Probe mit dem entsprechenden berechneten Nullwert verrechnet. 65

Beispiel 4

Messung von Realproben

- 5 Probleme treten bei allen Beispielen auf, wenn stark matrixbelastete Proben (Oberflächenwasser, Abwässer, Blut, Urin, etc.) vermessen werden sollen. Hier werden die Proben je nach Belastung um den Faktor 1 : 1 bis 1 : 100 mit PBS-Puffer verdünnt, der je 1% Tween 20 und Polyacrylsäure, sowie 0,1% BSA enthält. Diese Zusätze haben keine signifikanten Einfluß auf die Empfindlichkeit des Assays, der Einfluß von Störstoffen wird dagegen stark reduziert. Die Messung erfolgt dann wie unter Beispiel 1–3 beschrieben. Eine Verdünnung ist auch bei stark konzentrierten Proben sinnvoll.
- 10 Einerseits gelangt man auf diese Weise in den quasi-linearen Bereich der jeweiligen Methode, zudem werden aber auch Memoryeffekte im System reduziert bzw. sogar vermieden.

Beispiel 5

15 Miniaturisierung

Das Verfahren der vorliegenden Anmeldung eignet sich besonders gut zur Miniaturisierung, da für weitgehend alle Komponenten miniaturisierte Varianten verfügbar sind. So sind Pumpen, Ventile, faseroptische Bauteile, CCD-Systeme in entsprechend kleinen Bauformen erhältlich. Abb. 5 zeigt ein System, das eine erste Stufe der Miniaturisierung darstellt. Der Bau höher integrierter Systeme hängt vorwiegend von der Verfügbarkeit entsprechender Bauteile ab. Ein bevorzugtes System wird wie folgt gekennzeichnet: Die Integration eines flächenhaften Detektors (wie CCD-Chip) erfolgt mit einem kompakten faseroptischen System und einer Meßfläche in einer Kammer, die an miniaturisierte Pumpen und/oder Ventile angeschlossen ist. Eine besonders hohe Integration kann erzielt werden, wenn zudem sämtliche Steuerungselemente und für die Auswertung und Darstellung des Ergebnisses benötigten Rechenchips auf einem Silizium-Chip (oder einem Chip-Ensemble) vereinigt werden. Die ggf. benötigten Reagenzlösungen können in einem Kartuschen-System, einem Konzentrationsystem oder in Form von gefriergetrockneten Pulvern/Tabletten/Filmen zur Verfügung gestellt werden.

Patentansprüche

- 30 1. Verfahren zur Multikomponenten-Analyse von Fluiden, dadurch gekennzeichnet, daß
- die Analyse eines Analyten oder die parallele Analyse mehrerer Analyten ermöglicht wird,
 - dessen Multikanaldetektion durch Ortsauflösung der immobilisierten Reagenzien erreicht wird,
 - eine hohe Skalierbarkeit des Systems vorhanden ist,
 - Bindungsmoleküle verschiedener Spezifität verwendet werden,
 - die Reaktionen in einem oder wenigen (max. 10) Kompartment(en) ablaufen,
 - nur eine oder wenige (maximale Probenanzahl=Anzahl der Kompartmente) Proben parallel abgearbeitet werden,
 - die Kreuzreaktionen der Bindungsmoleküle mittels chemometrischer Verfahren für die Analyse genutzt werden können,
 - mindestens 10 unabhängige Meßkanäle und/oder mindestens 10 diskrete, räumliche Meßbereiche vorhanden sind.
- 35 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Referenzwert (Nullwert) bestimmt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß eine Meß- und Reaktionskammer verwendet wird, die eine leicht austauschbare Wand besitzen kann, auf deren Oberfläche Reagenzien immobilisiert sind.
- 40 4. Verfahren nach Anspruch 1, 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet daß eine physikalisch unstrukturierte Oberfläche zur Immobilisierung von Reagenzien verwendet wird. Die Strukturierung wird durch Beschichtungen oder die lokale Immobilisierung selbst erzielt.
- 45 5. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß optische Detektionsverfahren verwendet werden. Insbesondere solche Systeme sind günstig, die aus einem hoch-lichtstarken Linsensystem, und/oder einem oder mehreren hoch-lichtstarken Spiegel(n), und/oder einer oder mehreren faseroptischen Platte(n), und/oder einer oder mehreren Tapern (faseroptisches Bauteil), und/oder einer oder mehreren faseroptischen Bündeln, und/oder einer oder mehreren Grin(Gradientenindex)-Linsen, und/oder einer oder mehreren Grin(Gradientenindex)-Linsen-Zeile(n), und/oder einer oder mehreren Grin(Gradientenindex)-Linsen-Platte(n) bestehen, und in Kombination mit Meßsystemen mit mehreren Kanälen verwendet werden, wie Photodiodenzeilen, CCD-Chips (charge-coupled-device), CID-Chips (charge-injection-device), PDA-Chips (photo-diode-array), Mehrkanal-Photomultipliern, Mikrokanalverstärkerplatten, optische Verstärker sonstiger Bauweise oder chemische Detektoren (wie photographische Emulsionen). Bevorzugt werden luft- oder flüssigkeitsgekühlte CCD-Chips in back-illuminated-Bauweise.
- 50 6. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß durch eine vollautomatische Auswertung eine Meßwertkorrektur und eine Selbstkalibrierung stattfinden kann und automatische Verfahren zur Fehlerkontrolle, Anzeige von Matrix-Störungen und/oder Qualitätskontrolle des Meßsystems zur Anwendung gelangen, die auf der Parallelisierung des Verfahrens beruhen.
7. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Messung von thermodynamischen Konstanten und/oder kinetischen Konstanten oder deren empirisches Äquivalent zur Charakterisierung von Substanzen und/oder zur Identifizierung und/oder Quantifizierung von Analyten herangezogen wird.
- 55 8. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5, 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß der/die in Flüssigphase zugesetzte(n) Reaktand(en) (Bindungsmolekül, z. B. Antikörper; Marker-Hapten-Konjugat oder ähnliche Reagenzien) sich nicht im Gleichgewicht mit den oberflächen-immobilisierten Reagenzien befindet/befinden.

DE 197 36 641 A 1

9. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß Variationen der Meßparameter zur Identifizierung und/oder Quantifizierung von Analyten herangezogen werden, z. B. durch Zusatz von Additiven (wie Tensiden, Lösungsmitteln, pH-verschiebenden Puffern, Inhibitoren, Komplexbildnern, Bindungsmolekülen zur Unterdrückung von Störungen (auch Antikörpern, Haptenen, chenischen Reagenzien) oder auch durch Temperaturänderungen und photochemische Prozesse. 5
10. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß Verdünnungen der Probe zur Erweiterung des Meßbereichs und zur Detektion/Behebung von Störungen verwendet werden. 10
11. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß das System oder Teile des Systems einer Miniaturisierung unterworfen wird/werden, die zu einem integrierten Meßsystem hoher Leistung führt. 15
12. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Regenerierung durch Dissoziation, Spaltung oder Zersetzung von Reagenzkomplexen durch geeignete Reagenzlösungen oder Änderung der Reaktionsbedingungen (z. B. Temperatur) möglich ist. 15
13. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß nicht-optische Meßsysteme mit mehreren Kanälen verwendet werden, wie Arrays oder andere Anordnungen von Elektroden, Piezowägen, akustischen Oberflächenwellenleitern oder analogen Systemen. 15
14. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß getrennt oder in Kombination polyklonale, durch Affinitätsreinigung fraktionierte polyklonale (pseudo-monoklonale), monoklonale, rekombinante und andere Antikörper(derivate), die u. a. monovalent und/oder bivalent sein können, Nucleinsäuren und deren auch synthetische Derivate (z. B. PNA), Lectine, Protein A, Protein G, Cyclodextrine, Enzyme, Apoenzyme, Rezeptoren, "Molecular Imprints", synthetische Antikörper, synthetische Kavitanen, Komplexliganden, synthetische oder semisynthetische Polymere oder andere, auch selbstindizierende, Wirts-Gast-Systeme als Bindungsmoleküle verwendet werden. 20
15. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß optisch detektierbare Markierungen verwendet werden, wie Chemilumineszenz-Marker, bevorzugt Peroxidase mit Luminol-Reagenzien(gemischen), Alkalische Phosphatase mit Dioxetan-Reagenzien(gemischen), beta-Galactosidase mit Dioxetan-Reagenzien-(gemischen), Luminol-Derivate, Dioxetan-Derivate, sowie Acridinium-Ester; Biolumineszenz-Marker, bevorzugt Leuchtkäfer-Luciferase/Luciferin, bakterielle Luciferase/Luciferin und Aequorin; Fluoreszenz-Marker in Kombination mit einer zusätzlichen Anregungslichtquelle (z. B. mit schnellen Verschlüssen, optischen oder akustooptischen Modulatoren versehene Lampen, Leuchtdioden, Laserdiode, sonstige Laser, Blitzlampen oder Deuteriumlampen) verwendet werden, bevorzugt Fluorescein-Derivate, Rhodamin-Derivate, Hydroxypyrentrisulfonsäure-Derivate, Perylen-Derivate, fluoreszierende bzw. Phosphoreszenz zeigende Lanthaniden-Chelate, Phycoerythrine, Cyaninfarbstoffe und andere NIR-Fluoreszenz-Farbstoffe; fluorogene Substrate und chromogene Substrate in Kombination mit den passenden Enzymen, wie 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, ABTS, 4-Nitrophenylphosphat, sowie andere Farbstoffe (UV, VIS, NIR), die z. B. durch ihre Absorption empfindlich nachgewiesen werden können. 30
- 35
16. Verfahren nach Anspruch 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß das System eingesetzt wird
- für die Analyse von Körperflüssigkeiten, wie Blut, Serum, Speichel, Urin 40
 - zur Diagnostik von Infektionskrankheiten
 - zur Immundiagnostik
 - zur Status-Diagnostik bzw. Vorsorge-Diagnostik
 - zur Analyse von Lebensmitteln (z. B. Zusatzstoffe, Verfälschungen, Pestizidrückstände, Verderb, Toxine)
 - zur Analyse von Umweltproben (Wasser, Boden, Luft, Lebewesen)
 - zum Naturstoffscreening 45
 - zum Screening von Wirkstoffen (z. B. pharmazeutisch, agrarisch, tiermedizinisch)
 - zum High-Throughput-Screening (HTS)
 - zum Rezeptor-Screening (das z. B. Substanzen auf die Wirkung auf eine Vielzahl von Rezeptoren untersuchen soll)
 - zur Analyse von kombinatorischen Syntheseansätzen
 - zur Analyse von Strukturelementen (Strukturanalyse)
 - zur Abschätzung bzw. Vorhersage von Toxizitäten
 - zur Messung bzw. Abschätzung von Toxizitätsäquivalenten
 - zur Notfallanalytik von vergifteten Personen oder Tieren
 - zur Analyse von rekombinanten, modifizierten und natürlichen Proteinen und Proteinmischungen 55
 - zur Analyse Nukleinsäuren und deren Derivaten
 - zur Prozeßanalytik z. B. in der Biotechnologie und in der chemischen Industrie
 - zur Analyse von Rohwasser, Trinkwasser, Abwasser, zum Fließwasser-Monitoring, als Wasserkontaminationsalarm-Sensor, zur Kontrolle und Steuerung von Wasseraufbereitungsanlagen.
- 60

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

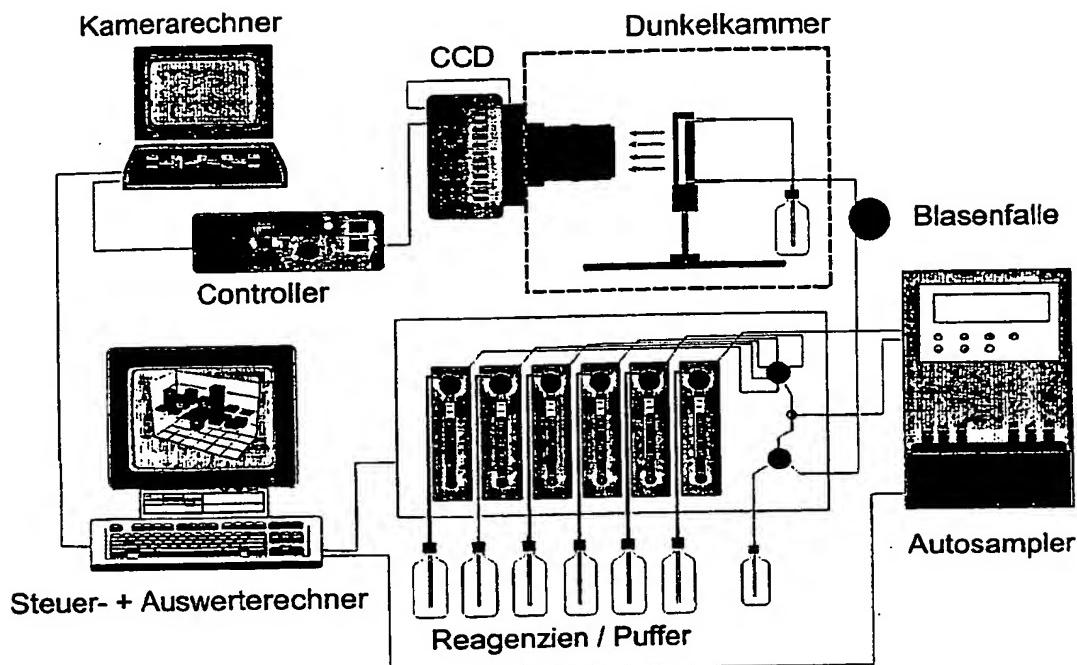


Abb. 1: Aufbau eines automatischen Meßsystems

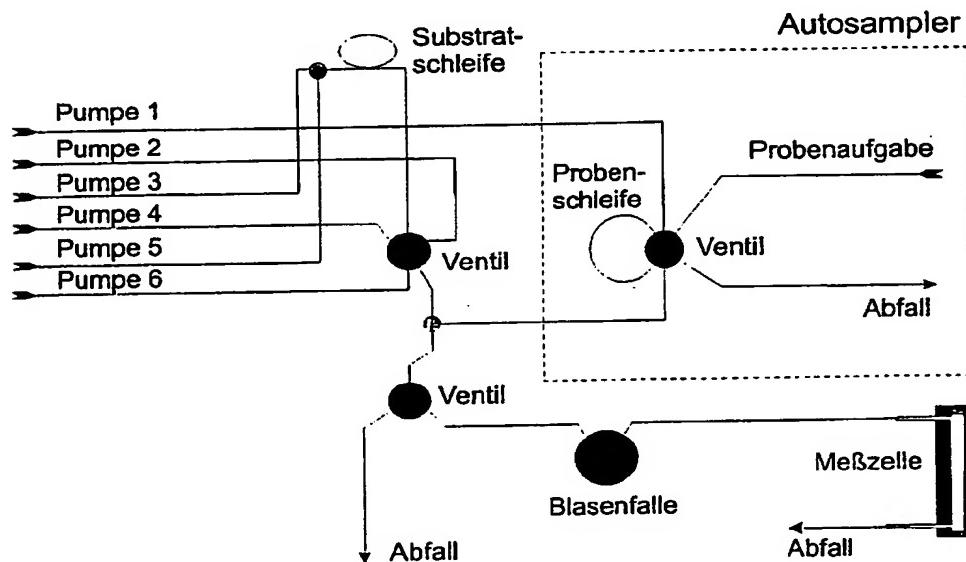


Abb. 2: Schematische Darstellung eines geeigneten Flußsystems

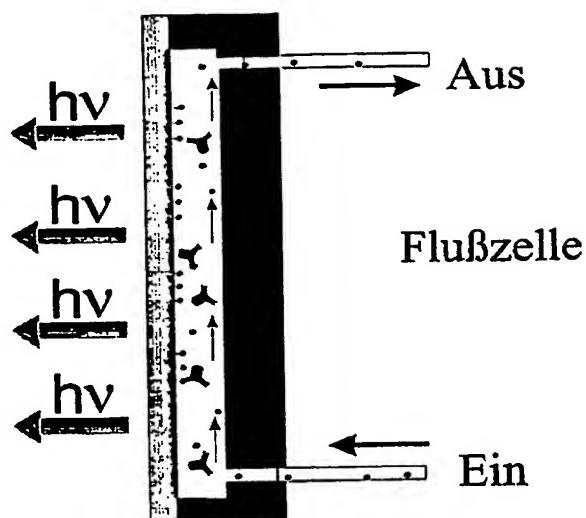


Abb. 3: Beispiel für eine Durchflußzelle (schematisch)

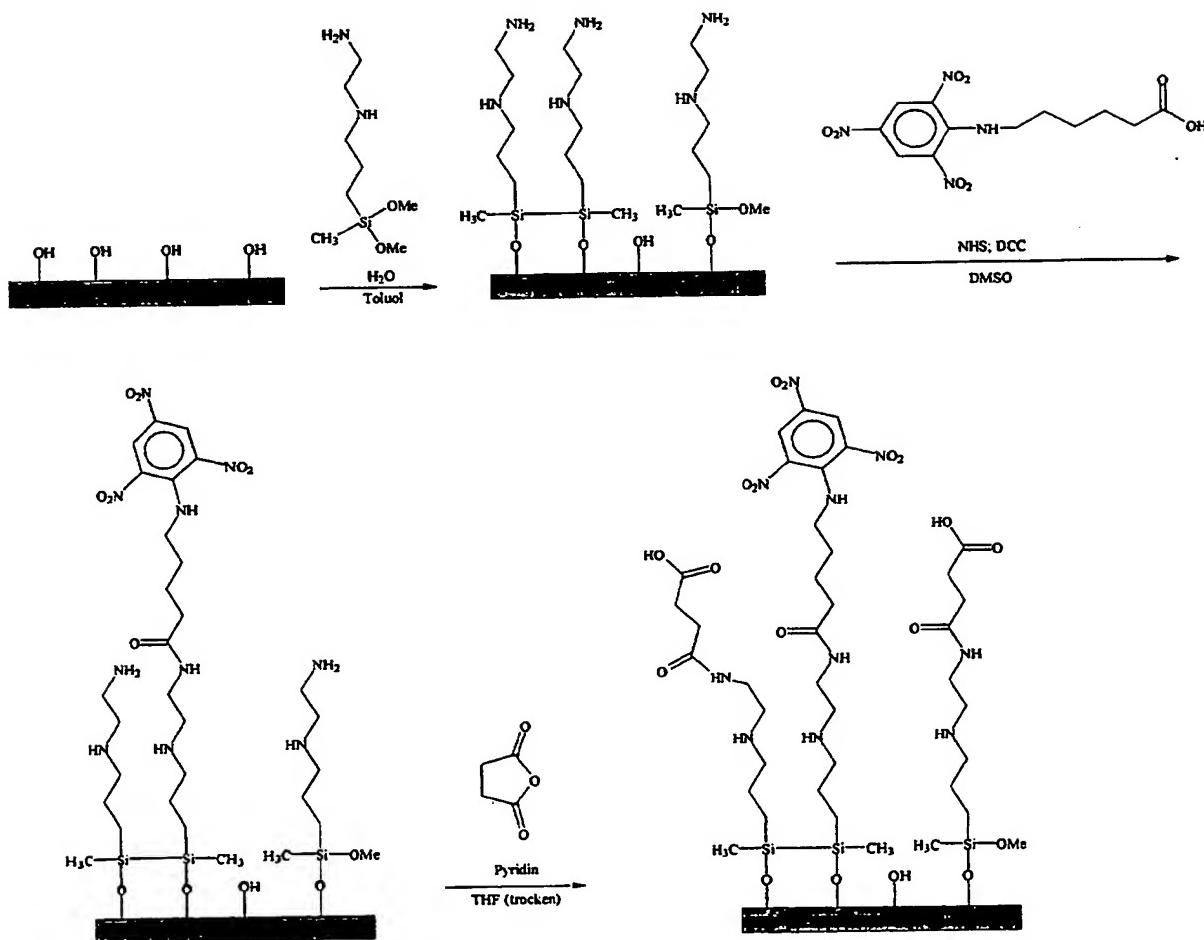


Abb. 4: Beschichtung von Glasoberflächen für das indirekte Assayformat

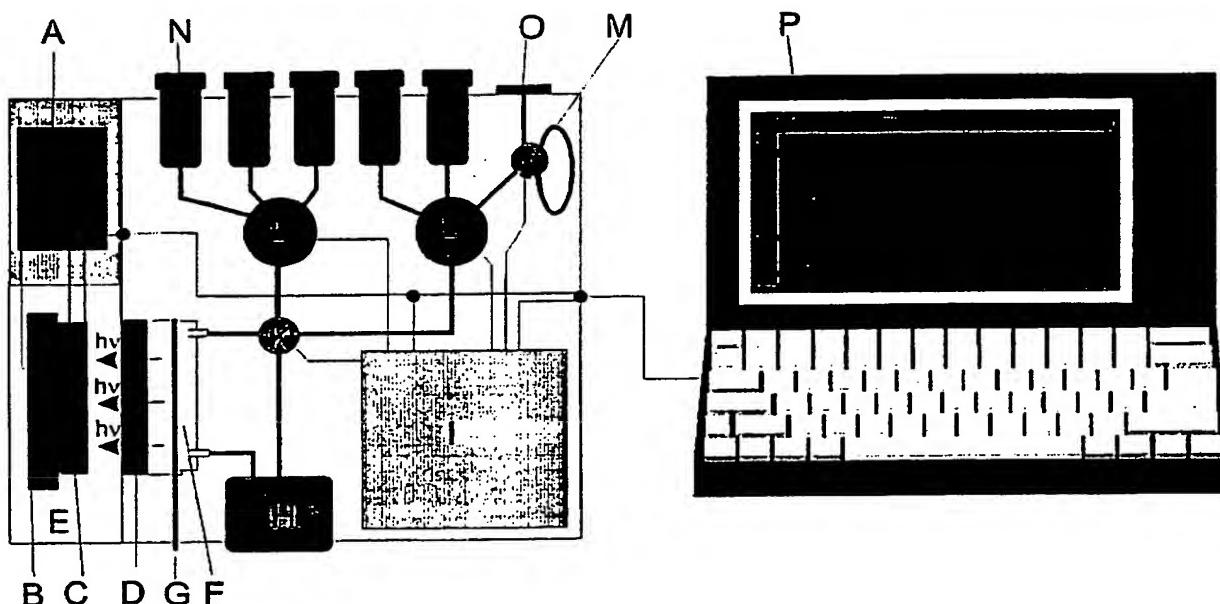


Abb. 5: Beispiel für eine miniaturisierte und portable Sensoranordnung

- A: CCD-Controller-Einheit
- B: Peltier-Kühlung für CCD-Chip
- C: CCD-Chip
- D: Gradientenindexlinsen-Array
- E: Vakuumkammer
- F: Flusszelle
- G: Wechselbarer Sensorchip
- H: Abfallbehälter
- I: Steuerelektronik für Flussystem und CCD
- K: Mischeinheit mit Verteilerventil
- L: Pumpe, gekoppelt mit Mehrwegeventil
- M: Injektionsventil mit Probenschleife
- N: Reagenzien-Behälter
- O: Injektionsventil
- P: Tragbarer Computer

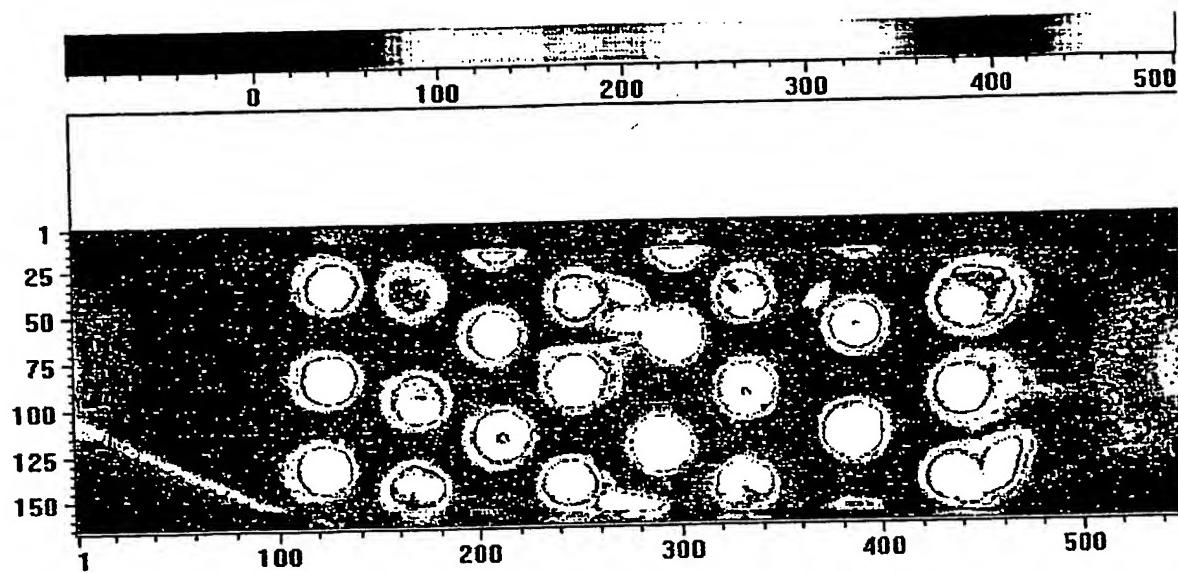


Abb. 6: Einfacher Array mit lumineszierenden Spots (Blindwert-Messung).

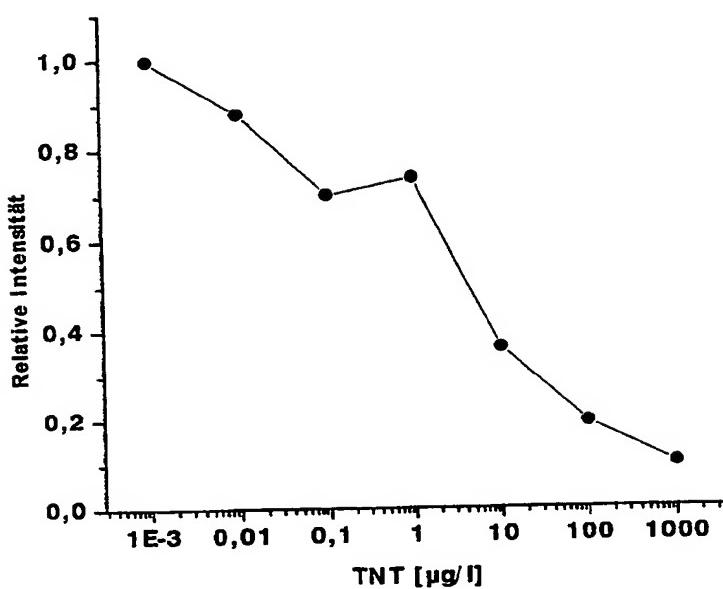


Abb. 7: TNT-Kalibrierung auf Protein-A-System

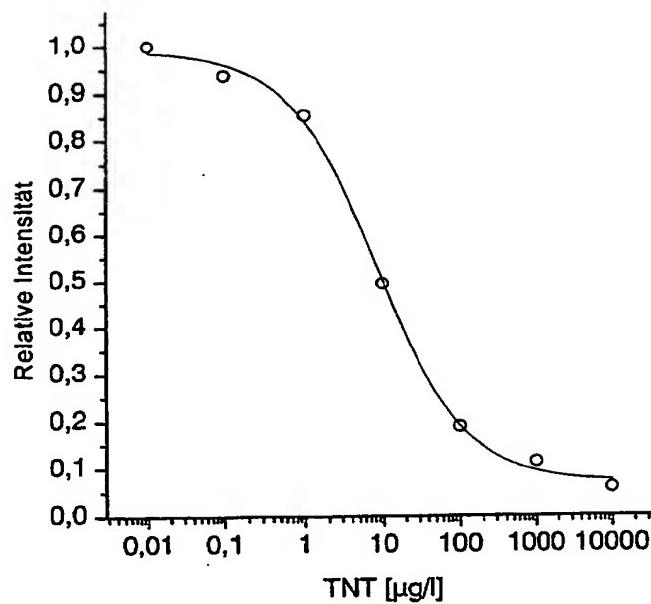


Abb. 8: Kalibrierung für TNT (indirektes Format)

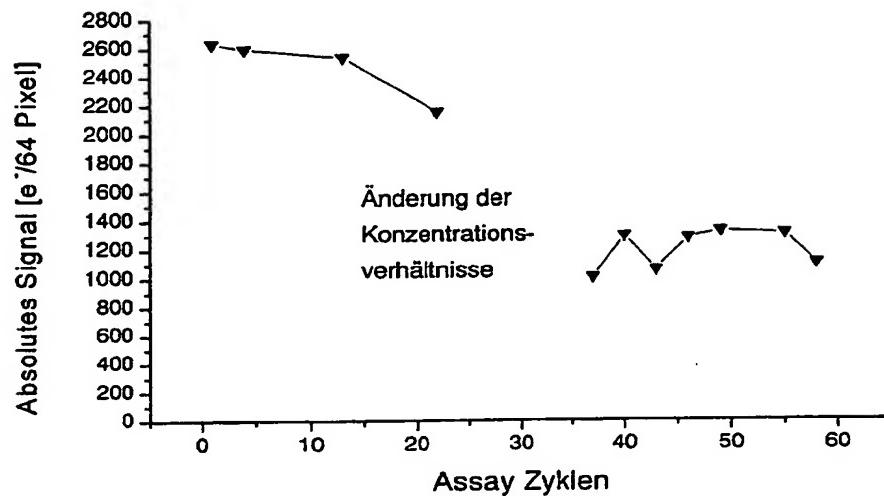


Abb. 9: Regenerierbarkeit der Chips im indirekten Assayformat

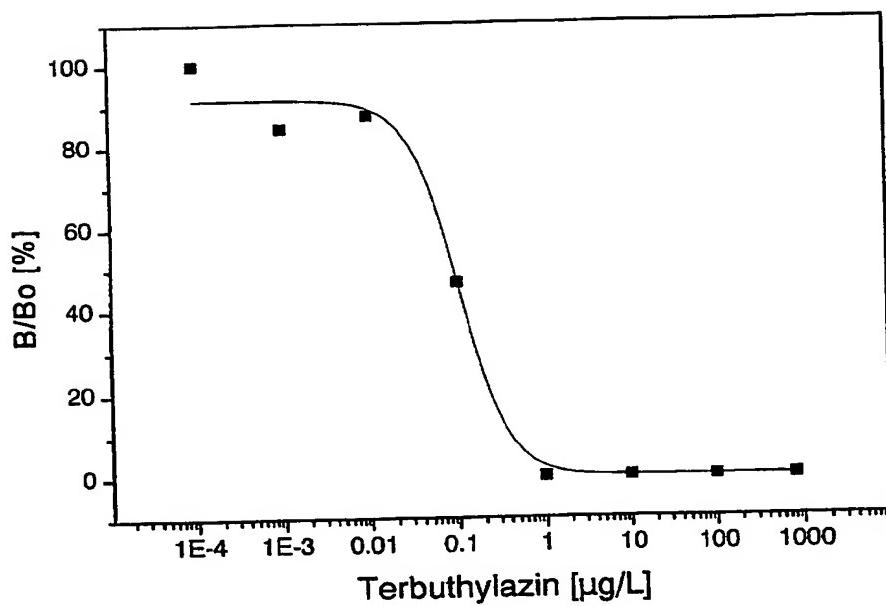


Abb. 10: Kalibrierungskurve im direkten Assayformat

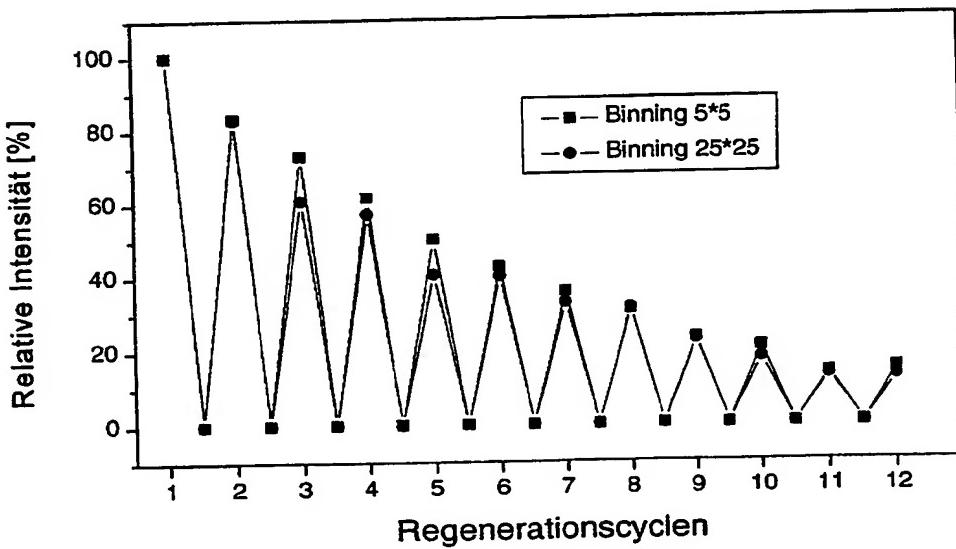


Abb. 11: Regeneration und Binning im direkten Assayformat

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (cont'd.)